

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Martina Fejtková**

**Chimérické antigenní receptory (CAR) v léčbě nádorů**

Chimeric antigen receptors (CARs) in cancer treatment

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jana Macková, Ph.D.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. května 2016

Podpis: .....

**Poděkování:**

Chtěla bych velmi poděkovat své školitelce RNDr. Janě Mackové, Ph.D. za vedení této bakalářské práce, cenné rady a za její čas, který mi při přípravě této práce věnovala.

Dále bych chtěla poděkovat i RNDr. Janu Musilovi, Ph.D. a RNDr. Šárce Němečkové, DrSc. za jejich trpělivost, konzultace, odborné rady a poskytnuté vědecké materiály.

## Abstrakt

Chimérický antigenní receptor (CAR) je uměle vytvořený receptor T-lymfocytů skládající se z extracelulární části vázající antigen, tvořené jednořetězcovou protilátkou, transmembránové oblasti a intracelulární signální domény spouštějící aktivaci buňky. Má tedy přednosti cílené specifity monoklonální protilátky a zároveň schopnost aktivovat T-lymfocyty svými aktivačními kostimulačními doménami. T-lymfocyt nesoucí CAR je schopen vyhledat a eliminovat cílovou buňku s daným povrchovým antigenem a zároveň aktivovat i ostatní složky imunitního systému produkcí cytokinů. CAR T-lymfocyty představují obrovský potenciál v léčbě hematologických malignit a výzkum přináší i nové úspěchy v modifikaci CARů pro eliminaci solidních nádorů.

**Klíčová slova:** Chimérický antigenní receptor (CAR), imunoterapie, T-buněčný receptor (TCR), únik nádoru před imunitním systémem, CD3ζ, CD28, 4-1BB, OX40, antigeny asociované s nádory (TAA), antigeny specifické pro nádory (TSA)

## Abstract

Chimeric antigen receptor (CAR) is an artificial T-lymphocyte receptor consisting of extracellular single chain antibody serving as antigen binding site, transmembrane part and intracellular part which activates the cell. Therefore, it has the advantage of targeted specificity of monoclonal antibody and artificially strengthened activation of the T-lymphocyte by activation and costimulation domains. T-lymphocyte with CAR is able to locate and eliminate target cell with given surface antigen and also activate other compartments of the immune system by cytokine production. CAR T-lymphocytes have a huge potential for treatment of hematological malignancies and research also comes with new achievements in CAR modification for elimination of solid tumors.

**Keywords:** Chimeric antigen receptor (CAR), immunotherapy, T-cell receptor (TCR), tumor immune evasion, CD3ζ, CD28, 4-1BB, OX40, tumor associated antigens (TAA), tumor specific antigens (TSA)

## Obsah

Abstrakt .....	iv
Abstract.....	iv
Obsah .....	v
Seznam zkratk.....	vi
1 Úvod.....	9
2 Struktura a funkce chimérického antigenního receptoru.....	10
2.1 Extracelulární část .....	10
2.1.1 Nádorové antigeny.....	11
2.2 Transmembránová část.....	13
2.3 Intracelulární část .....	13
2.3.1 CD3ζ doména – 1. generace CAR.....	13
2.3.2 CD28 doména – 2. generace CAR .....	14
2.3.3 Domény 4-1BB a OX-40 – 3. generace CAR .....	14
2.4 Porovnání s přirozeným T-buněčným receptorem .....	16
3 Imunoterapie pomocí CAR T-lymfocytů .....	18
3.1 Princip imunoterapie .....	18
3.2 Překážky a omezení v léčbě CAR T-lymfocyty .....	20
3.2.1 Vedlejší účinky terapie a antigeny asociované s nádory .....	20
3.2.2 Únikové mechanismy nádorových buněk před imunitním systémem.....	22
3.3 Dosavadní výsledky léčby u různých typů nádorů.....	24
3.3.1 Leukémie .....	24
3.3.2 Solidní nádory .....	26
3.3.2.1 Neuroblastom .....	26
3.3.2.2 Karcinom prsu .....	27
3.3.2.3 Karcinom ledvin.....	27
3.3.2.4 Karcinom vaječníků .....	28
3.3.2.5 Mezoteliom.....	28
4 Závěr.....	29
5 Literatura .....	30

## Seznam zkratek

Zkratka	Význam česky	Význam anglicky
<b>Ag</b>	antigen	antigen
<b>APC</b>	buňky prezentující antigen	antigen presenting cells
<b>B-ALL</b>	akutní B-buněčná lymfoblastická leukémie	B-cell acute lymphoblastic leukemia
<b>B-CLL</b>	chronická B-buněčná lymfoidní leukémie	B-cell chronic lymphocytic leukemia
<b>BCR</b>	B-buněčný receptor	B-cell receptor
<b>CAIX</b>	karboanhydráza IX	carbonic anhydrase IX
<b>CAR</b>	chimérický antigenní receptor	chimeric antigen receptor
<b>CART</b>	CAR T-lymfocyt	CAR T-lymphocyte
<b>CCR2</b>	chemokinový receptor 2. typu	chemokine receptor type 2
<b>CCL2</b>	ligand pro chemokinový receptor 2. typu	chemokine receptor type 2 – ligand
<b>CD</b>	diferenciační skupina	cluster of differentiation
<b>CEA</b>	karcinoembryonální antigen	carcinoembryonic antigen
<b>CML</b>	chronická myeloidní leukémie	chronic myeloid leukemia
<b>CRS</b>	syndrom vysoké hladiny cytokinů	cytokine release syndrom
<b>ERBB2</b>	lidský epidermální růstový faktor	human epidermal growth factor
<b>FasL</b>	ligand buněčné smrti	cell death ligand
<b>FcεRγ</b>	Fc-epsilon receptor gamma	Fc-epsilon receptor gamma
<b>FR</b>	folátový receptor	folate receptor
<b>GD2</b>	disialogangliosid	disialoganglioside
<b>HLA</b>	lidský leukocytární antigen	human leukocyte antigen
<b>iCAR</b>	inhibiční CAR	inhibitory CAR
<b>IDO</b>	indolamin-2,3-dioxygenáza	indoleamine 2,3-dioxygenase
<b>IFN</b>	interferon	interferon
<b>Ig</b>	imunoglobulin	immunoglobulin
<b>IL</b>	interleukin	interleukin
<b>IS</b>	imunitní systém	immune systém

<b>ITAM</b>	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv	immunoreceptor Tyrosin-based activation motif
<b>LAT</b>	linker aktivovaných T-lymfocytů	activated T-cell linker
<b>Lck</b>	lymfocytární protein tyrosin kináza	lymphocyte specific protein tyrosin kinase
<b>mAb</b>	monoklonální protilátka	monoclonal antibody
<b>MAPK</b>	mitogenem aktivovaná proteinkináza	mitogen-activated protein kinase
<b>MAF</b>	faktor aktivující makrofágy	macrophage activating factor
<b>MCL</b>	lymfom pláštěvých buněk	mantle cell lymphoma
<b>MHC</b>	hlavní histokompatibilní komplex	major histocompatibility complex
<b>MSLN</b>	mezotelin	mesothelin
<b>NF-κB</b>	nukleární faktor kappa B	nuclear factor kappa B
<b>NHL</b>	Non-Hodgkinův lymfom	Non-Hodgkin lymphoma
<b>NK buňky</b>	přirozeně cytotoxické lymfocyty	natural killer cells
<b>PI3K</b>	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát-3-kináza	phosphatidylinositol-4,5- - bisphosphate-3-kinase
<b>PKB</b>	proteinkináza B	protein kinase B
<b>PKC</b>	proteinkináza C	protein kinase C
<b>scFv</b>	jednořetězcový variabilní fragment	single-chain variable fragment
<b>SH2</b>	Src homologní doména 2	Src homology 2 domain
<b>Src</b>	Src tyrosinkináza	tyrosin protein-kinase Src
<b>TAA</b>	antigen asociovaný s nádorem	tumor associated antigen
<b>TanCAR</b>	tandemový chimérický antigenní receptor	tandem chimeric antigen receptor
<b>TCR</b>	T-buněčný receptor	T-cell receptor
<b>TGF</b>	transformační růstový faktor	transforming growth factor
<b>T<sub>h</sub>1</b>	pomocné T-lymfocyty 1	T-helper cell 1
<b>TNF</b>	faktor nádorové nekrózy	tumor necrosis factor
<b>TNFR</b>	receptor pro faktor nádorové nekrózy	tumor necrosis factor receptor
<b>T<sub>reg</sub></b>	regulační T-lymfocyt	regulatory T cell

<b>TRUCK</b>	T-lymfocyty pro univerzální cytokinovou likvidaci	T-cells redirected for universal cytokine killing
<b>TSA</b>	antigen specifický pro nádor	tumor specific antigen
<b>V<sub>H</sub></b>	těžký řetězec imunoglobulinu	heavy immunoglobulin chain
<b>V<sub>L</sub></b>	lehký řetězec imunoglobulinu	light immunoglobulin chain
<b>ZAP</b>	proteinkináza asociovaná se ζ řetězcem	zeta-chain associated proteinkinase



# 1 Úvod

T-lymfocyty spadají do lymfoidní vývojové větve spolu s B-lymfocyty a NK buňkami. V lidském těle zastávají jednu z nejdůležitějších funkcí, jsou základem adaptivní buněčné imunity a spolu s dalšími spoluúčastníky imunitního systému chrání tělo před patogeny a před tělu vlastními poškozenými buňkami. T-lymfocyty jsou dvojího typu. Prvním typem jsou  $CD8^+$  lymfocyty, rozeznávající peptidy v komplexu s molekulami MHC I (hlavní histokompatibilní komplex). Druhým typem jsou  $CD4^+$  lymfocyty rozeznávající peptidy navázané na MHC II. MHC molekuly jsou v lidském organismu nazývané HLA (lidský leukocytární antigen) molekuly. Prostřednictvím těchto molekul jsou T-lymfocytům prezentovány peptidy, které jsou rozpoznávány pomocí antigenně specifických receptorů na povrchu T-lymfocytů (TCR). TCR je složen z části rozeznávající antigen a z části složené z komplexu proteinů, kterému se říká CD3 komplex. Ten pak zajišťuje přenos signálu do buňky.

Naopak chimérický antigenní receptor (CAR) je pouze jediný, synteticky vytvořený receptor. Funguje na základě rozpoznání antigenu, jeho navázání a následné aktivace T-lymfocytu, který začne produkovat lymfokiny a zahájí destrukci cílové buňky produkcí granzymů a perforinů. T-lymfocyty s CAR (CART), jsou tedy stejně jako běžné T-lymfocyty schopné velmi efektivně navázat určitý antigen a pak pomocí cytolytického aparátu eliminovat nežádoucí buňku. Mohou být tedy použity v imunoterapii. Další důležitou vlastností CART by měla být jejich persistence v těle pacienta a dlouhodobá exprese chimérického receptoru. Vedle toho je neustále potřeba balancovat poměr mezi destruktivitou a šetrností k organismu.

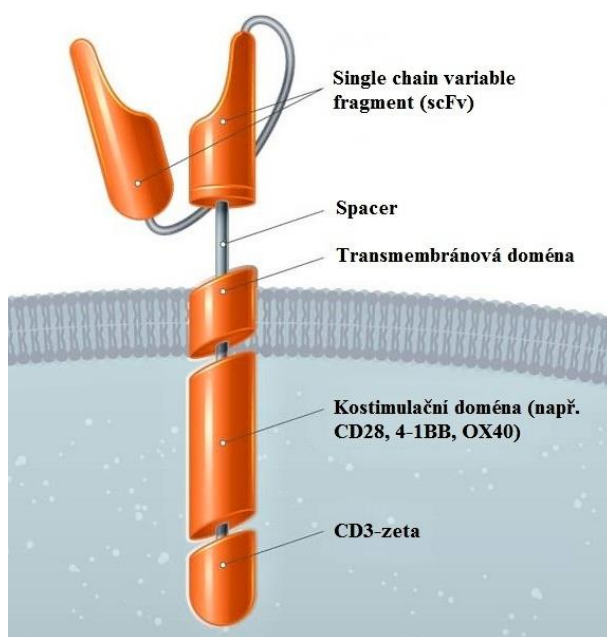
CARy jsou tedy navrženy a sestaveny tak, aby efektivně vyhledaly a navázaly antigeny nádorových buněk. Jejich historie začíná již před více než 20 lety a před jejich samotným vznikem byl důležitý výzkum samotných T-lymfocytů, které mohly být později využity pro buněčnou terapii (Mitchison, 1955). Základní stavba i nosiče CARů se v průběhu let výzkumu několikrát změnila. Použity byly nejprve NK buňky (Natural Killer Cells), které již přirozeně protinádorovou aktivitu mají a jejich obohacení o CAR zajistilo cílení antigenu a lepší aktivaci NK buňky. V průběhu výzkumu se ukázalo, že nejlepším testovaným nosičem pro CAR jsou centrální paměťové T-lymfocyty ( $T_{CM}$ ), kvůli delší perzistenci v organismu (Jensen and Riddell, 2014). Vývoj cílených T-lymfocytů započal izraelský tým Zelig Eshhara v roce 1993 (Eshhar et al., 1993), *in vitro* již v roce 1989. Samotný výzkum CART rozvinul a zdokonalil Carl June a jeho tým z Pensylvánské univerzity.

Cílem této práce je představit chimérické antigenní receptory, jejich funkci při imunoterapii, dosažené výsledky a problémy v léčbě onkologických pacientů.

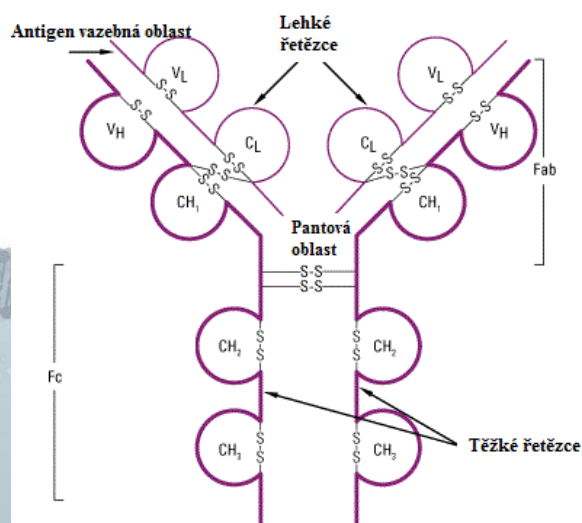
## 2 Struktura a funkce chimérického antigenního receptoru

### 2.1 Extracelulární část

Extracelulární část CARu je oblast, která je zodpovědná za rozpoznání antigenu. Tvoří ji zpravidla jednořetězcový variabilní fragment (scFv), který je zkonstruován na základě monoklonální protilátky (Lee et al., 2015). Jedná se o fúzní protein složený z variabilní části těžkého a lehkého řetězce ( $V_H$  a  $V_L$ ) imunoglobulinu, které jsou spojeny krátkým peptidovým řetězcem (tzv. linker) (Casucci and Bondanza, 2011). ScFv má k sobě na N-konci  $V_H$  připojen signální peptid, který slouží k nasměrování vznikajícího proteinu do endoplasmatického retikula. Bylo zjištěno, že těžký a lehký řetězec je stejně účinný ve vazbě antigenu, jako přirozeně se vyskytující Fab fragment (Eshhar et al., 2001). Extracelulární část CARu je spojena s transmembránovou částí tzv. spacerem. Ten je velmi flexibilní, zajišťuje pohyb extracelulární části a tím usnadňuje její vazbu k antigenu. Jako spacer se využívá pantová oblast z imunoglobulinu třídy G1 ( $IgG_1$ ) nebo část molekuly CD3 (Obrázek 1 a 2).



**Obrázek 1** - Stavba chimérického antigenního receptoru, single chain variable fragment je odvozen od monoklonální protilátky (upraveno podle webu Juno Therapeutics, 2014)



**Obrázek 2** - Struktura imunoglobulinu, jehož část vázající antigen je použita v scFv CARu (upraveno podle webu ThermoFisher Scientific, 2015)

### 2.1.1 Nádorové antigeny

Nádorové antigeny, které mohou být rozpoznávané extracelulární doménou CARů, můžeme rozdělit na dva hlavní typy, antigeny asociované s nádory (TAA) a antigeny specifické pro nádory (TSA).

**TAA** mohou být libovolné proteiny, které nádorová buňka syntetizuje. Nejsou nijak odlišné od antigenů, které mohou být exprimovány na normálních buňkách organismu, kde se však vyskytují v mnohem menší míře. Těchto antigenů je velké množství, často jsou vyplavovány do krevního oběhu a zde mohou sloužit jako diagnostické znaky pro indikaci nádorového bujení (Zarour and Ferrone, 2011). Příkladem takového TAA, který je exprimován na normálních buňkách je karcinoembryonální antigen (CEA). Najdeme ho na vyvíjejících se buňkách embrya, v dospělosti je pak hladina CEA minimální a zvýšená je nejčastěji u karcinomů tlustého střeva, plic, prsu, vaječníků nebo slinivky (Boon et al., 1997). TAA jsou hojně využívány jako vhodné cíle nejen v imunoterapii pomocí CAR T-lymfocytů. Nevýhodou při cílení přirozeně se vyskytujícího antigenu je však ničení zdravých tkání.

Druhou skupinou jsou **TSA**, které se vyskytují pouze na nádorových buňkách. CARy rozpoznávají nádorové antigeny lokalizované pouze na povrchu nádorových buněk, nádorové antigeny se však běžně objevují na různých místech buňky (v cytoplasmě, zakotvené v membráně, v jádře nebo sekretované z buňky). V **tabulce 1** jsou uvedeny důležité TAA a TSA.

Antigen	Celý název	Normální tkáň	Nádorová tkáň
<b>TAA</b>			
<b>MAGE</b>	Melanomový Antigen E	Varlata, Placenta, Melanocyty	Plíce, Melanom, Hltan
<b>AFP</b>	$\alpha$ -fetoprotein	Embryonální buňky	Hepatom
<b>CEA</b>	Karcinoembryonální antigen	Embryonální buňky	Karcinom tlustého střeva
<b>HER2/neu</b>	Receptor epidermálního růstového faktoru 2	Epiteliální buňky	Karcinomy mléčné žlázy
<b>PSA (p30)</b>	Prostatický specifický antigen	Prostatická žláza	Karcinom prostaty
<b>EpCAM</b>	Buněčná epitelová adhezní molekula	Epiteliální buňky	Hepatocelulární karcinom, Karcinom prsu
<b>CD19</b>		B-lymfocyty	B-CLL, B-ALL, B-NHL
<b>CD20</b>		B-lymfocyty	Lymfomy, B-NHL
<b>ROR1</b>	Tyrosinkinázový receptor třídy XII	Nezralé B-lymfocyty	B-CLL, lymfom z buněk plášťové zóny, některé solidní nádory
<b>CALLA (CD10)</b>	Antigen obecné akutní lymfoblastické leukémie	Pre-B lymfocyty	ALL
<b><math>\gamma</math> řetězec (CD132)</b>	Gamma řetězec cytokinového receptoru	Leukocyty	CLL, ALL
<b><math>\kappa</math> řetězec</b>	Lehký řetězec Kappa imunoglobulinu	Imunoglobuliny	CLL
<b>Mesothelin</b>		Mesotheliální buňky	Karcinom slinivky
<b>TSA</b>			
<b>BRCA 1/2 mutace</b>	Antigen rakoviny prsu		Karcinom prsu, vaječníků
<b>Bcr-Abl</b>	Fúzní protein na filadelfském chromozomu		CML
<b>Proteiny onkogenních virů</b> – např. SV40, EBV, polyomavirus, HPV16 E6, E7 (karcinom děložního čípku)			
<b>Atypické BCR, TCR</b>	Unikátní antigenní struktury na B a T receptorech		Nádory odvozené od B nebo T lymfocytů

**Tabulka 1** - Výběr antigenů asociovaných s nádory (TAA) a nádorově specifických antigenů (TSA) – (Boon & van der Bruggen, 1996; Boon et al., 1997; Chomez et al., 2001; Chandan et al., 2016; Morgan et al., 2010; Shipp et al., 1989; Adusumilli et al., 2014; Hermanson and Kaufman, 2015; Kufe et al., 2003)

## 2.2 Transmembránová část

Druhou funkční částí CARu je transmembránová část. Bývá to segment CD3 $\zeta$  nebo CD8 domén, který zajišťuje přenos aktivačního signálu, vzniklého jako odpověď na úspěšné navázání antigenu. Transmembránová část je zpravidla hydrofobní  $\alpha$ -helix, procházející fosfolipidovou dvojvrstvou (Bridgeman et al., 2010).

## 2.3 Intracelulární část

Intracelulární část CARu, endodoména, je místem, kam se přenáší signál po rozpoznání antigenu. Jejím základem je CD3 $\zeta$  doména složená ze tří molekul imunoreceptorového tyrosinového aktivačního motivu (ITAM, viz níže). Ne vždy je signál od CD3 $\zeta$  dostatečný pro plnou aktivaci T-lymfocyту, proto byly k této doméně postupně přidávány další signální domény kostimulačních molekul a vznikaly nové, účinnější generace CARů (Finney et al., 2004; Hombach and Abken, 2011). Použití různých domén pak mění stabilitu receptoru. Jako nejefektivnější se ukázala doména CD28 (Bridgeman et al., 2010). Základní rozdělení CARů na základě stavby intracelulární domény uvádím dále (Obrázek 3).

### 2.3.1 CD3 $\zeta$ doména – 1. generace CAR

První chimérický antigenní receptor byl složen z řetězce scFv z monoklonální protilátky, transmembránové části a z CD3 $\zeta$  signální domény z T-buněčného receptoru. K použití CD3 $\zeta$  domény bylo přistoupeno, jelikož v porovnání s jinými doménami odvozenými od jiných aktivačních receptorů, jako např. Fc $\epsilon$ R $\gamma$ , vedla stimulace prostřednictvím CD3 $\zeta$  k mnohem větší produkci cytokinů a obecně k lepší cytotoxické aktivitě CART (Haynes et al., 2001). Další výhodou CD3 $\zeta$  domény je, že obsahuje 3 ITAM schopné indukovat aktivační signalizaci, zatímco jiné proteiny CD3 komplexu obsahují po 1 ITAM. Toto je velmi důležité, jelikož se kombinace 3 ITAM sekvencí ukázaly jako efektivnější v aktivaci buněk, což je pravděpodobně dáno schopností ITAM amplifikovat svou účinnost (Lsakov, 1997). CD3 $\zeta$  doména se ve stavbě CARů osvědčila i v pokročilých generacích a je používána ve fázi klinických testů.

Takto sestavený CAR pak předává signál k aktivaci efektorovým T-lymfocytům. Díky specifické vazbě k antigenu je možné cíleně vyhledávat a rozpoznávat antigeny exprimované především na nádorových buňkách, kdy T-lymfocyt prostřednictvím receptoru přijme signál k aktivaci a zahájí lýzu nežádoucí buňky (Eshhar et al., 1993).

### 2.3.2 CD28 doména – 2. generace CAR

1. generace CAR byla sice převratnou ve specifickém cílení antigenů, měla veškeré funkce, kterými napodobovala aktivaci T-lymfocytů jejich přirozenými receptory, umožnila využít všechny přednosti protilátkové specifity a zároveň zachovat destruktivní vlastnosti T-lymfocytů, nicméně CAR nebyl schopen aktivovat T-lymfocyt dostatečně nebo se jeho efektivita v průběhu času ztrácela. Ne zcela optimální funkce 1. generace CAR byla zřejmě dána tím, že pro plnohodnotnou aktivaci T-lymfocytu nestačí pouze signály z TCR, ale je vyžadován také druhý signál z kostimulačního receptoru – např. CD28, který rozpoznává molekuly CD80 a CD86. Bez kostimulačního signálu může v T-lymfocytech docházet k anergizaci (Boomer and Green, 2010). Klíčovou částí ve fungování CD28 je její krátká intracelulární doména, která ovšem obsahuje molekulární motivy obsahující tyrosin. Fosforylace těchto motivů vytváří vazebná místa pro proteiny obsahující Src homologní doménu 2 (SH2). Jako významná se jeví např. vazba fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát-3-kinázy (PI3K) (Boomer and Green, 2010). PI3K aktivuje signální dráhy vedoucí přes aktivaci proteinkinázy B (PKB), které hrají nezastupitelnou roli v přežívání a proliferaci buněk (Garcon et al., 2008). Z těchto důvodů byla vyvinuta 2. generace CARů, v níž se k účinné signální doméně CD3ζ připojuje doména odvozená od kostimulační molekuly CD28. Druhá generace CAR se pak nazývá 28ζ a skládá se tedy z scFv, transmembránové části a intracelulární části, ve které jsou za sebou připojeny domény CD28 a CD3ζ (scFv-CD28-ζ).

CD28 není pouze pomocná doména sloužící k zesílení odpovědi na antigen. Napomáhá také proliferaci, sekreci cytokinů a spouští *in vivo* protinádorovou aktivitu (Moeller et al., 2004). Nicméně CARy s CD28 doménou vždy nedokáží spouštět cytolytickou aktivitu a jiné studie oponují, že nemá ani proliferační ani cytokinovou aktivitu (Haynes et al., 2002; Hombach et al., 2001).

### 2.3.3 Domény 4-1BB a OX-40 – 3. generace CAR

Ve 3. generaci CAR se pro podání kostimulačních signálů využívají intracelulární domény odvozené od 4-1BB (CD137) nebo OX-40 (CD134). CARy s těmito doménami se pak nazývají BBζ nebo OXζ (Imai et al., 2004). V pokročilých konstruktech se pak tyto dvě kostimulační domény kombinují řazené v tandemu.

#### 4-1BB

4-1BB (CD137) je přirozeně se vyskytující transmembránový glykoprotein, patřící do skupiny receptorů pro tumor nekrotizující faktor (TNFR), běžně se vyskytuje na CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> buňkách nebo NK buňkách, ale také může být exprimován dendritickými buňkami, granulocyty, endoteliálními buňkami nebo monocyty.

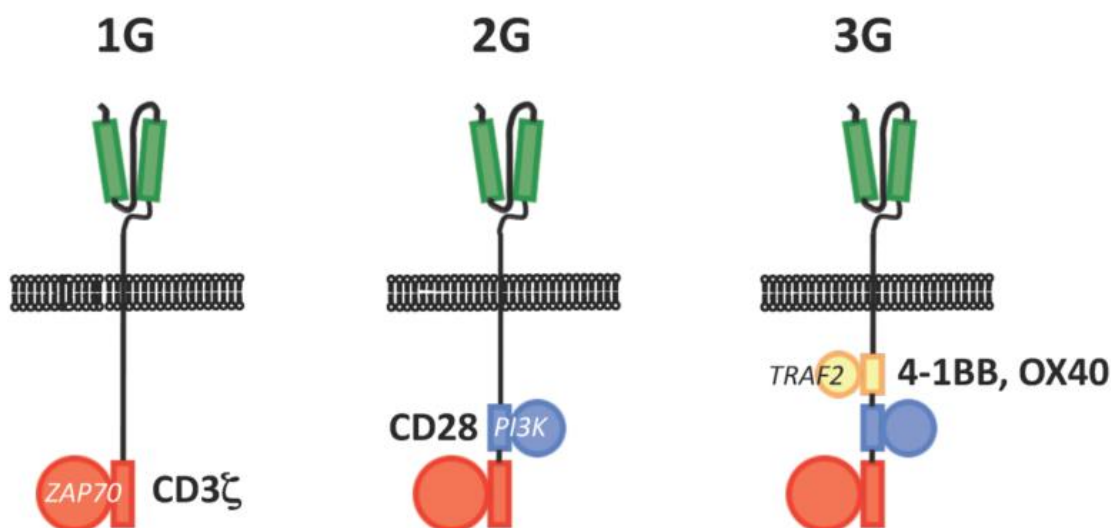
Pro CAR je využita signalizační doména této kostimulační molekuly a je zařazena do intracelulární části receptoru, kde slouží opět k zesílení T-lymfocytární odpovědi. Aktivace T-lymfocytu vede přes signální dráhu NF-κB přes TRAF 1, 2 a 3 (faktory spojené s TNF receptory), které aktivují mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK). MAP kinázová dráha následně vede ke zvýšení buněčné proliferace a cytotoxické aktivity (Vinay and Kwon, 2011; Wen et al, 2002). Inkorporace 4-1BB do CARu zajistí i vyšší produkci cytokinů a stabilizuje buňku, tedy zvyšuje její perzistenci v organismu, která je pro CAR nezbytná (Carpenito et al., 2009).

#### OX-40

OX-40 (CD134) také patří do skupiny TNFR, jedná se o přirozený membránový glykoprotein o velikosti 50 kDa (Godfrey et al., 1994). Do CARu byla zařazena doména kostimulační molekuly OX-40 v kombinaci s CD28 a CD3ζ pro zvýšenou stimulaci T-lymfocytu.

Signální dráha OX-40 v CARu vede přes TRAF a tvorbu signalizačního komplexu, jehož součástí je proteinkináza C (PKC), která přes další komplex aktivuje NF-κB signální dráhu (So et al., 2011). Alternativním způsobem je signalizace spuštěna pomocí PI3K přímou cestou přes proteinkinázu B (PKB) (So and Croft, 2013).

Signalizace z OX-40 spouští klonální expanzi buněk a prodloužení persistence T-lymfocytů při antigenní odpovědi (Taraban et al., 2002).



**Obrázek 3** - Schéma stavby 1. – 3. generace CAR, rozdělení podle intracelulárních domén. 1G – První generace využívá pouze doménu CD3 $\zeta$ , má požadovanou cytotoxicitu, ale špatnou aktivaci buňky, 2G – Druhá generace již zahrnuje jednu kostimulační doménu CD28, je vylepšena aktivace buňky, 3G – Třetí generace kombinuje dvě kostimulační domény, 4-1BB a OX40, tato generace kombinuje cytotoxicitu, správnou aktivaci buňky a perzistenci v organismu pacienta (upraveno podle Casucci and Bondanza, 2011).

## 2.4 Porovnání s přirozeným T-buněčným receptorem

TCR a CAR se velmi liší. TCR má velkou výhodu v tom, že umí zacílit i na intracelulární soubory proteinů a je funkční po celou dobu života buňky, CAR rozpoznává pouze povrchové struktury a *in vivo* perzistence může být omezená (Ramos et al., 2014).

TCR je komplex antigenně specifických  $\alpha$  a  $\beta$  řetězců (popřípadě  $\gamma$ ,  $\delta$ ), které jsou asociované s tzv. CD3 komplexem, tvořeným řetězcí CD3 $\gamma$  a CD3 $\delta$ , 2 řetězcí CD3 $\epsilon$  a 2  $\zeta$  řetězcí nesoucími velké cytoplasmatické domény (Obrázek 4). CD3 domény mají po 1 molekule ITAM, zatímco  $\zeta$  řetězec obsahuje 3. S tímto komplexem je úzce spřažena skupina Src proteinkináz (Pitcher and Van Oers, 2003). Pro aktivaci T-lymfocytu jsou důležité i další molekuly, včetně receptorové tyrosin fosfatázy CD45, koreceptoru CD4 nebo CD8 a intracelulárních Src tyrosin-kináz.

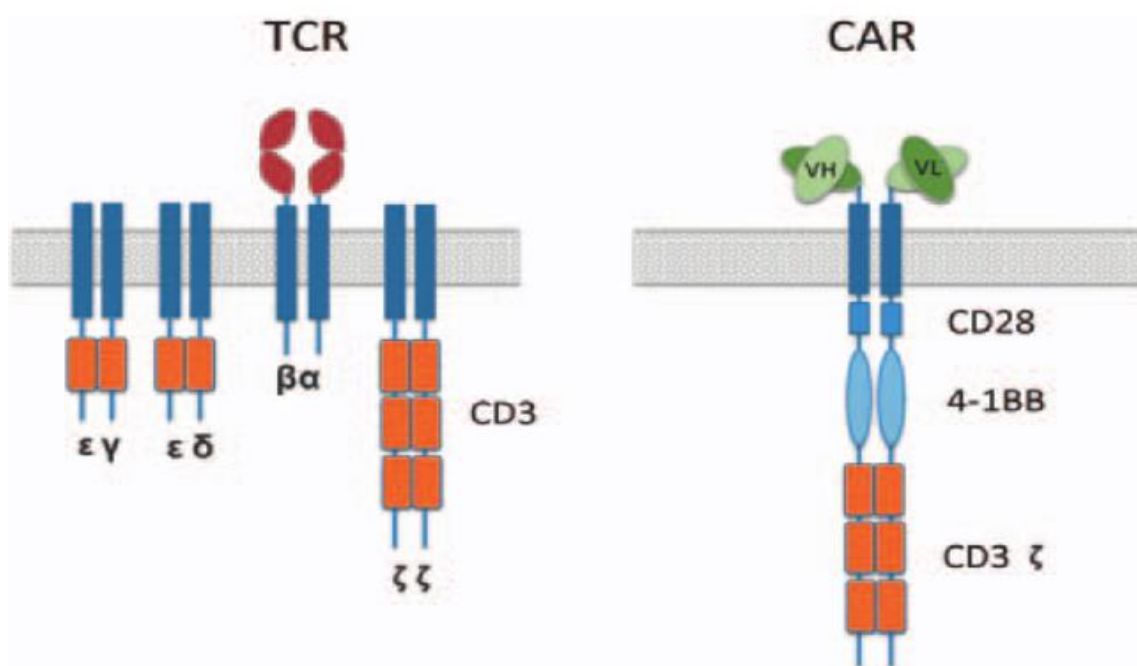
TCR rozpoznává komplex antigenního peptidu a MHC za pomoci koreceptorů CD4 nebo CD8, s jejichž cytoplazmatickými konci asociuje Src kináza Lck. Tato je aktivována prostřednictvím receptorové tyrosin fosfatázy CD45, která odstraňuje inhibiční fosfáty na Tyr505 (Huntington and Tarlinton, 2004). Lck pak následně fosforyluje ITAM na molekulách CD3 komplexu včetně CD3 $\zeta$  řetězce. S fosforylovanými ITAM interaguje následně kináza



ZAP70, která je aktivována fosforylací prostřednictvím Lck. Aktivovaná ZAP70 následně fosforyluje LAT, což vede k vytvoření LAT signalosomu, z něhož vychází celá řada drah důležitých pro aktivaci a diferenciaci T-lymfocytu (Brownlie and Zamoyska, 2013).

Hlavní rozdíl mezi CAREm a TCR je v mechanismu rozpoznávání antigenu. Zatímco TCR rozpoznává antigen vystavený na MHC glykoproteinech, CAR rozpoznává antigen nezávisle na MHC. Mohou to být rozmanité typy molekul, např. cukry, proteiny nebo gangliosidy a důležitá je pouze přítomnost tohoto antigenu na povrchu cílové buňky. To umožňuje daleko větší efektivitu, jelikož tak dokáže obejít únikové mechanismy nádorů, jako jsou různé mutace a defekty v prezentaci antigenů nebo snížení exprese MHC (Casucci and Bondanza, 2001).

Zajímavé je, že dle výzkumu Bridgeman et al. 2010, CAR (přesněji pouze jeho CD3 $\zeta$  část) interaguje s TCR/CD3 komplexem. Není jisté, zda CAR tvoří heterodimery s přirozenou CD3 $\zeta$  (pravděpodobně pomocí disulfidických můstků) nebo ji nahrazuje. Je tím však zajištěna optimální odpověď na rozpoznáný antigen. Pokud inkorporován do přirozeného TCR není, často dochází ke snížené expresi CAR na povrchu buňky.



**Obrázek 4** – Rozdíl ve stavbě mezi T-buněčným receptorem a chimérickým antigenním receptorem (upraveno podle Wieczorek and Uharek, 2013)

### 3 Imunoterapie pomocí CAR T-lymfocytů

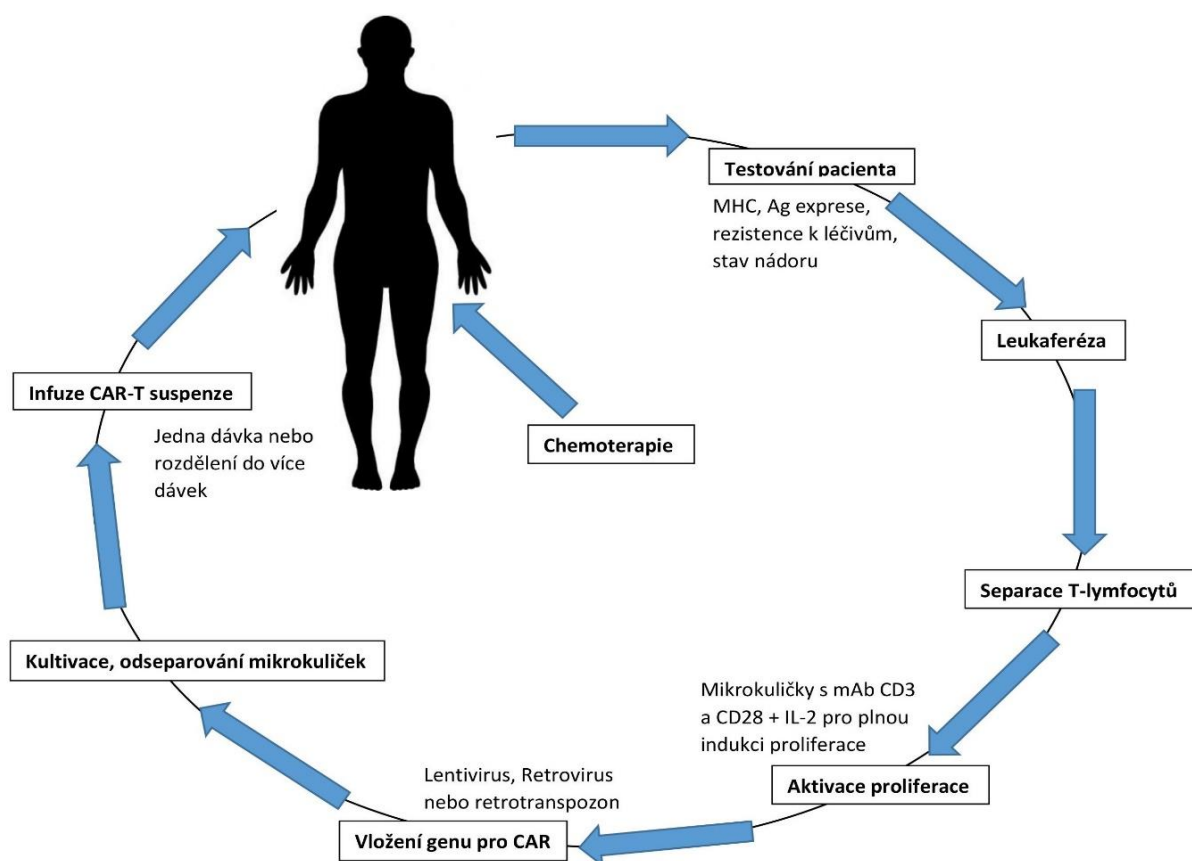
#### 3.1 Princip imunoterapie

Terapie CAR T-lymfocyty má stále mnoho nedostatků, hlavně v působení na solidní nádory. V léčbě hematologických malignit již ale zaznamenala mnoho úspěchů a je ve fázi klinického testování nebo již zařazena do léčby. Pacientovi, který podstupuje imunoterapii CAR T-lymfocyty, jsou nejdříve odebrány leukocyty z krve, tzv. leukaferézou. Z nich se poté oddělí pouze T-lymfocyty a začne příprava *in vitro* (Obrázek 5).

Do T-lymfocytů jsou geny pro CAR s příslušnou antigenní specifitou transfekovány pomocí lentivirových nebo retrovirových vektorů či transpozonů. Vektory založené na lentivirech, mají oproti retrovirovým vektorům velkou výhodu v integraci do nedělících se buněk. Integrace genu vede k permanentní expresi, jelikož se gen integruje do hostitelského genomu. Další výhodou je inserce, bez porušení konstruktů.

Pomocí retrovirového vektoru dojde k vložení inzertu do transkripčně aktivních oblastí hostitelského genomu. Exprese CAR je pak dlouhodobá až trvalá. Nevýhodou je, že retrovirus umí vnést gen pouze do dělících se buněk (Suerth et al., 2012).

Dalším typem vektoru jsou transpozony, mezi které patří např. Sleeping Beauty. Jedná se o nevirovou metodu pro vložení genu do hostitelského T-lymfocytu. Transpozony nemají mechanismus pro překonání buněčné membrány, musejí být dopraveny do buňky jinak než virové vektory (např. elektroporací). Mají však nesporné výhody jako vysokou expresi daného genu, nepotřebují aktivovaný T-lymfocyt, unesou velký „náklad“ genů a jsou spojeny s nízkým rizikem inserční mutagenese (Wieczorek and Uharek, 2013). Konkrétně, Sleeping Beauty náhodně včlení gen pomocí transpozázy do oblasti bohaté na thymin a adenin. Tento transpozon je uměle vytvořený, respektive jeho transpozáza byla znovuvytvořena z fosílie mutovaných genů lososovitých ryb (Izsvák et al., 2000).



**Obrázek 5** – Zjednodušené schéma imunoterapie – od odebrání leukocytů pacientovi, až po chemoterapii a infuzi CAR T-lymfocytů (popis podle Wieczorek and Uharek, 2013)

Vložené geny jsou exprimovány a zajišťují v buňce povrchovou expresi CARů (Eshhar et al., 2001). Ty jsou schopny rozeznávat cílové antigeny nádorových buněk. Takto upravené T-lymfocyty jsou pak pěstovány a množeny *in vitro* zhruba 10 dní v prostředí mikrokuliček obalených monoklonálními protilátkami. Anti-CD3 a anti-CD28 protilátky simulují vazbu na TCR a kostimulaci pomocí vazby CD28 na CD80/CD86, díky čemuž dostane buňka plnohodnotný signál k proliferaci. Celý průběh přípravy CAR T-lymfocytů probíhá v ultra čistých prostorách, musí splňovat přísné podmínky a je pod neustálým dohledem regulačních úřadů. Vytvořená suspenze CART je následně infuzně podána zpět pacientovi. Podání CART je zároveň doprovázeno chemoterapií nebo imunodeplecí z důvodu eliminace některých, v těle existujících leukocytů. Pacient pak snáze přijme „nové“ CAR T-lymfocyty, které se v něm mohou začít množit. Pro imunodepleci se nejčastěji využívá cyklofosfamid nebo jiné imunosupresivum (případně kombinace dvou) podané zhruba 2-3 dny před infuzí CART, která se zpravidla podává ve dvou dávkách.

## 3.2 Překážky a omezení v léčbě CAR T-lymfocyty

### 3.2.1 Vedlejší účinky terapie a antigeny asociované s nádory

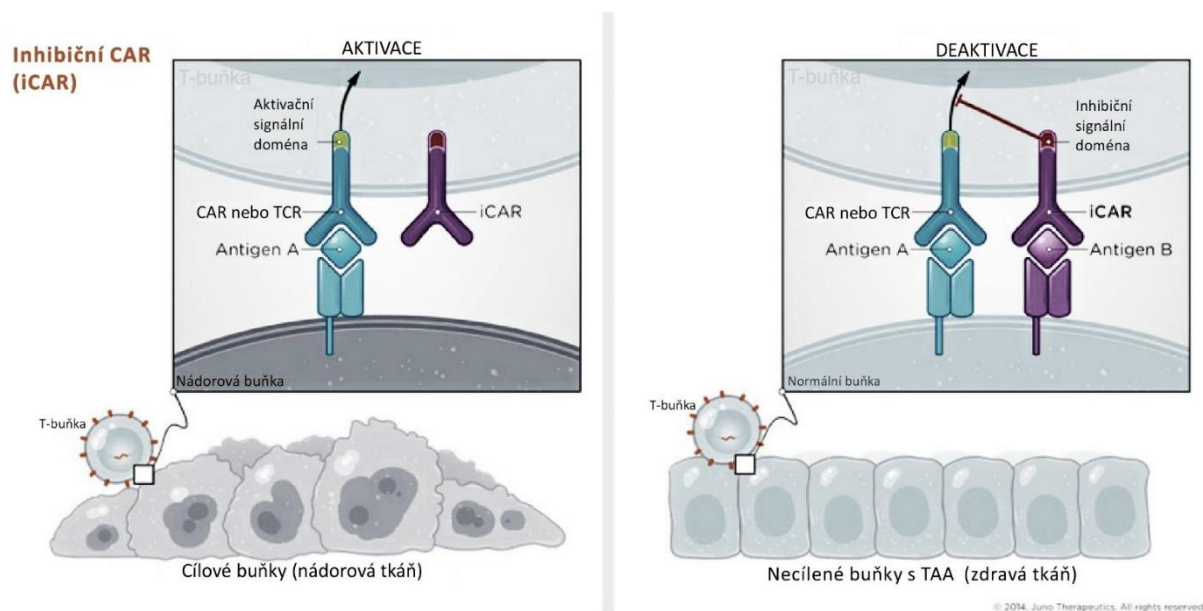
Léčba CAR T-lymfocyty je sice velkou nadějí v imunoterapii, stále však řeší problémy s vedlejšími účinky. Nejzávažnějšími jsou „on-target/off-tumor“ efekt a syndrom vysoké hladiny cytokinů (CRS – cytokine release syndrom). Nežádoucím účinkům se dá někdy předejít, např. přesně vypočítaným dávkováním (množství CART na hmotnost pacienta nebo rozdělením dávek do více dnů), důkladným vyšetřením pacienta před léčbou nebo přesným zjištěním všech lokací cílového antigenu.

„On-target/off-tumor“ efekt vzniká, když jsou TAA přítomné na zdravých buňkách. Ideálním řešením by bylo nalezení takového antigenu, který je na zdravých tkáních přítomen minimálně nebo vůbec a je silně exprimován na nádoru. Takové antigeny však téměř neexistují (Minagawa et al., 2015). Tento problém byl zjištěn při terapii CAREm proti HER-2/neu. HER-2/neu je antigen vyskytující se na nádorech prsu nebo trávicího traktu. V menší míře byla jeho exprese detekována také na plicních epiteliálních buňkách, což v případě dané terapie vedlo k fatální toxicitě a destrukci plic pacienta (Morgan et al., 2010).

Dalším častým problémem imunoterapie je CRS, popř. s ním spojená cytokinová bouře. CRS a cytokinová bouře jsou známy již více než 20 let a jsou nežádoucím vedlejším účinkem nejen imunoterapie pomocí CARů (Ferrara et al., 1993). Nejčastějšími symptomy CRS a cytokinové bouře jsou zvýšená teplota, bolesti hlavy, horečky, otoky, extrémní únava a závratě a mohou vést až k celkovému selhání organismu a smrti. Příčinou je spuštění pozitivní zpětnovazebné smyčky, při které cytokiny uvolněné CAR T-lymfocyty aktivují další buňky imunitního systému, produkující další prozánětlivé cytokiny, což celou reakci dále umocňuje. Látky produkované při CRS a cytokinové bouři nemusí být jen cytokiny, jako jsou TNF (Tumor necrosis factor), IL-6 (pyrogen), IL-1 (kostimulace T-lymfocytů, pyrogen), IL-8, MAF (faktor aktivující makrofágy), ale jsou to i kyslíkové radikály nebo koagulační faktory (Maude et al., 2014). Zamezit CRS, nebo alespoň snížit jeho závažnost, se dá změnou způsobu podání suspenze CAR T-lymfocytů, kdy je místo jednorázové injekce podána pomalou infuzí doplněnou o dávku antihistaminik a kortikosteroidů (Lee et al., 2014). Aktivované T-lymfocyty na svém povrchu exprimují kostimulační molekulu OX-40, jejíž vazba na OX-40L chrání daný T-lymfocyt před aktivací indukovanou buněčnou smrtí. Bylo zjištěno, že je možné zabránit CRS inhibicí aktivovaných T-lymfocytů pomocí fúzního proteinu tvořeného OX-40 a myším imunoglobulinem, který zabraňuje vazbě mezi OX-40 a OX-40L (Humphreys et al., 2003).

Vzhledem k závažným vedlejším účinkům byly započaty pokusy o vyvinutí jakéhosi „ovladače“ cytotoxicity CARů. Jeho úkolem by byla kontrola CART v jejich cílení, kde se právě nacházejí, jak dlouho budou působit a jak intenzivně budou likvidovat. Takového efektu by měly docílit např. tzv. malé molekuly řídící funkci CARu (ON-switch), podle jejichž hladiny by byla tlumena nebo aktivována funkce CART. Tímto mechanismem by mělo být možné regulovat množství CARů od neznatelného až po plnou expresi. Princip těchto CARů spočívá v rozdělení intracelulární domény na dvě části, které mohou za přítomnosti malé molekuly heterodimerizovat. V základním stavu je tedy inaktivní CAR tvořen klasicky scFv, kostimulačními doménami a sekvencí umožňující dimerizaci, ale postrádá CD3ζ nesoucí ITAM. Přidání malých molekul zajistí spojení tohoto inaktivního CARu s volnou intracelulární CD3ζ doménou, a tím plnou aktivaci CAR T-lymfocyty (Wu et al., 2015).

Na jiném principu pracuje CAR v kombinaci s inhibičním CAREm (iCAR). V případě nádorové buňky se naváže CAR na nádorový antigen a k druhé vazbě nedojde. Tím se aktivuje cytotoxicita CART. Pokud však CART narazí na zdravou tkáň, CAR se naváže na TAA a iCAR na přirozený ligand zdravé tkáně a inhibuje efektorové funkce CAR T-lymfocyty (Fedorov et al., 2013) (Obrázek 6).



**Obrázek 6** – Schéma funkce iCARu (upraveno podle webu Juno Therapeutics, 2014)

### 3.2.2 Únikové mechanismy nádorových buněk před imunitním systémem

Nádory mají, podobně jako patogeny, mechanismy pro únik před hostitelským imunitním systémem (IS), z nichž některé mohou být účinné i proti CAR T-lymfocytům. Tyto mechanismy ztěžují nebo úplně znemožňují obranu vlastního těla i působení léčby.

Nejrozšířenější mechanismus je snížená nebo vůbec žádná exprese MHC glykoproteinů I nebo změna ve fenotypu MHC, což pak zajistí „neviditelnost“ nádorových buněk pro CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty. Úplná ztráta MHC I se objevuje např. u kolorektálního karcinomu (Ahmad et al., 2004). Nádory mohou navíc také snižovat svou citlivost k IFN- $\gamma$ , který za normálních okolností zvyšuje expresi právě MHC I a tím podporuje antigenní prezentaci. Na povrchu nádorových buněk většinou chybí typické kostimulační molekuly jako je CD80 a CD86, které T-lymfocyty potřebují pro kompletní aktivaci.

Dalším únikovým mechanismem je antigenní drift, který je známý především u virů, ale byl pozorován i v případě nádorových buněk. Jedná se v podstatě o ztrátu exprese nádorového antigenu, resp. jeho minimální expresi, ke které může dojít v důsledku vysoké frekvence mutací v nádorových buňkách. V takovém případě imunitní systém nádorové buňky nevidí nebo je přehlíží. Mechanismus ztráty nádorového antigenu může interferovat i s účinností CART, jako bylo například pozorováno u karcinomu tlustého střeva, kde byl cílen CEA (Haynes et al., 2002). Nádorové buňky nemusí expresi antigenů jen potlačovat, ale mohou je různě modifikovat, jako například tzv. sialylací, což je změna v glykosylaci, která může zakrýt rozpoznávané antigenní epitopy. Mechanismy modulace exprese antigenu jsou různé a to dokonce i v rámci jednoho nádoru.

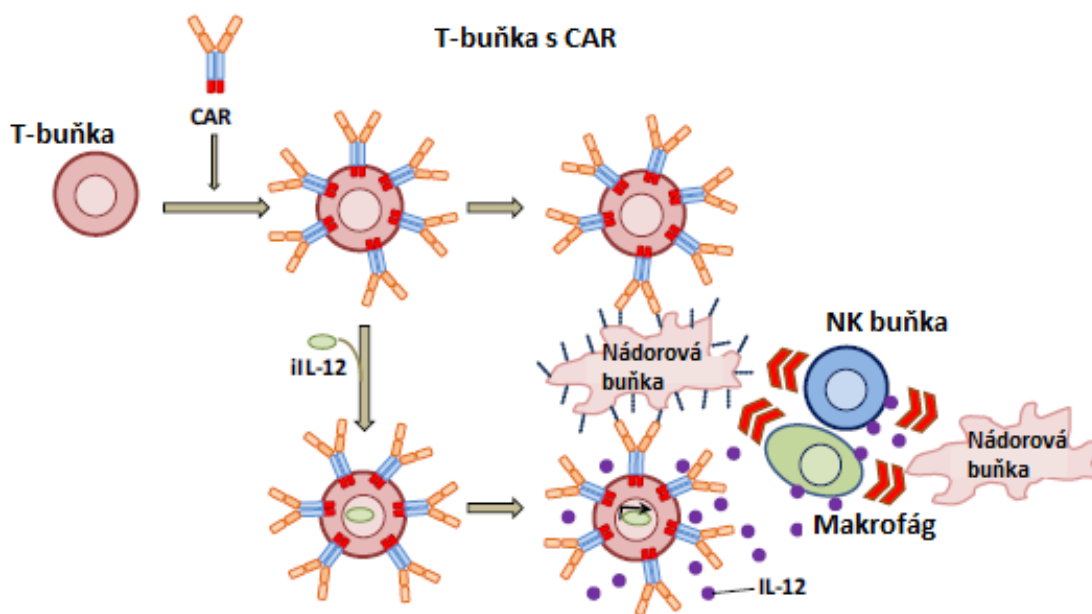
Dalším mechanismem jsou změny v expresi ligandu buněčné smrti, tedy FasL. Rozpoznávání receptorem Fas je klíčové pro udržování zdravé imunitní odpovědi, nádory mohou FasL exprimovat a tedy indukovat apoptózu jak v T-lymfocytech tak i v CART (Ahmad et al., 2004; Kunkele et al., 2015). Na principu inhibice funkce T-lymfocytů fungují i další únikové mechanismy, jako je např. produkce cytokinů nádorovými buňkami (např. IL-10, IL-4, TGF- $\alpha$  a  $\beta$ ) nebo solubilních nádorových antigenů, které jsou odštěpovány z povrchů buněk. Nádory také často produkují indolamin-2,3-dioxygenázu (IDO), enzym, který degraduje L-tryptofan, nezbytný pro vývoj T-lymfocytů. Bez L-tryptofanu nastává snižování exprese CD3 $\zeta$  řetězce v TCR komplexu a tento mechanismus se podílí i na snížení exprese CARu (Ninomiya et al., 2015).

Nádor jako takový není tvořen pouze buňkami nádorového bujení, ale jsou v něm zahrnuty běžné struktury. Tumor musí být prokrvený, obsahuje tedy cévy, je inervován a drží pohromadě vazivem a extracelulární matrix. Celé toto prostředí umí efektivně ničit nebo zeslabovat IS hostitele anergizací buněk IS produkcí látek (tlumivé cytokiny) i buněčnou obranou (regulační T-lymfocyty ( $T_{reg}$ ), myeloidní supresorové buňky).  $T_{reg}$  jsou imunoregulační lymfocyty a jsou nezbytné pro toleranci tělu vlastních antigenů. Inhibují proliferaci T-lymfocytů, proto by imunoterapie zaměřená proti těmto regulačním T-lymfocytům mohla být úspěšným krokem k léčbě nádoru. Myeloidní supresorové buňky s markery CD14, Sca-1/Ly6, gp130 a dalšími (Mandrizzato et al., 2016; Parker et al., 2015) mají pak schopnost tlumit produkci protilátek, funkci T-lymfocytů a jejich proliferaci a také snižují expresi CD3 $\zeta$  (Trédan et al., 2007). Kvůli komplexnímu nádorovému mikroprostředí se často imunoterapie kombinuje s imunosupresivní léčbou a chemoterapií.

Již několik let se výzkum snaží vylepšit působení CAR T-lymfocytů tak, aby zachoval jejich cytotoxicitu, ale obešel únikové mechanismy nádorových buněk (Brandl et al., 2007). Jedním z řešení a inovací v léčbě CART je tzv. bispecifický tandemový CAR (TanCAR). Ten se skládá z scFv proti 1. antigenu, linkeru, scFv proti 2. antigenu, pantové oblasti, klasické transmembránové části a intracelulární části složené z CD28 a CD3 $\zeta$ . Vše je zapojeno tandemově za sebou, v jednom receptoru. TanCAR, který rozeznává 2 různé antigeny, by mohl vyřešit mnoho problémů, které typické CARY mají, kvůli únikovým mechanismům nádorů. TanCAR umožňují CAR T-lymfocytům udržovat kontrolu nad nádory, které ztratily expresi jednoho antigenu. Při nerozeznání jednoho antigenu druhá specifita zajistí udržení cytotoxické aktivity proti nádorovým buňkám, díky rozpoznání druhého antigenu. V neposlední řadě, by mohly TanCAR umožnit CAR T-lymfocytům bojovat proti nádorům uvnitř nádorového mikroprostředí, kdy by jedna specifita mohla být namířena proti komponentám nádorového mikroprostředí a tak ho rozrušovat a pomocí druhé specifity by CART byly zacíleny na nádorový antigen (Grada et al., 2013).

Dalším řešením jak se vypořádat s únikovými mechanismy nádorů jsou tzv. **TRUCKs**, které jsou často nazývány čtvrtou generací CARů. Tento typ CARů již není příliš odlišný od předchozích svou stavbou či přítomností jiných kostimulačních domén, rozdíel je v obohacení o genovou sekvenci, která umožňuje CAR T-lymfocytům produkovat cytokin interleukin 12 (IL-12), proto název TRUCK (T-lymfocyty pro univerzální cytokinovou likvidaci). IL-12 je heterodimer p35-p40, který je běžně produkován dendritickými buňkami, makrofágy nebo neutrofily. Jeho funkcí je indukce diferenciaci  $T_H1$  (pomocné T-lymfocyty 1) z naivních T-lymfocytů (Trinchieri et al., 2003), dále stimuluje produkci interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) a faktoru

nádorové nekrózy  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). V případě TRUCK je produkce indukována po vazbě CARu na nádorový antigen. IL-12 se začne hromadit v poškozené tkáni, pomáhá k eliminaci nádoru díky aktivaci nespecifické imunity. Kombinace CARu a indukibilního IL-12 tak zvyšuje šanci na zničení i takových nádorových buněk, jejichž antigen je „neviditelný“ pro specifické rozpoznávání CAR T-lymfocyty (Chmielewski and Abken, 2012) (Obrázek 7).



**Obrázek 7** – Mechanismus působení TRUCK CAR pomocí IL-12 (upraveno podle Chmielewski et al., 2014)

### 3.3 Dosavadní výsledky léčby u různých typů nádorů

#### 3.3.1 Leukémie

Největším úspěchem CART imunoterapie je léčba hematologických malignit, tedy nádorů tkání a buněk spojených s krvetvorbou (kostní dřeň, lymfocyty atd.). Patří sem 3 základní typy: leukémie, lymfom a mnohočetný myelom. U těchto onemocnění jsou CARy primárně zacílené proti antigenu CD19, který je hojně exprimován na leukemických blastech, ale také na normálních B-lymfocytech, je to tedy TAA.

U **akutní B-buněčné lymfoblastické leukémie (B-ALL)** bylo zaznamenáno mnoho úspěšných terapií, ať už s částečným nebo úplným ústupem onemocnění. B-ALL má závažný průběh a především u dospělých, je pro dosažení dlouhodobého uzdravení nutná kompletní



remise. Při relapsu se pravděpodobnost úspěšné léčby ještě snižuje. Zde pomáhají CAR T-lymfocyty, které dlouhodobě perzistují v pacientovi. Bylo testováno 5 pacientů s relapsem B-ALL. Léčení byli infuzí druhé generace CAR T-lymfocytů, dávka byla stanovena na  $1,5-3 \cdot 10^6$  CAR T-lymfocytů/kg. Konstrukt obsahoval CD28 a CD3 $\zeta$  doménu a byl zacílen proti antigenu CD19. Léčba byla doprovázená chemoterapií cyklofosfamidem. Výsledkem této klinické studie bylo dosažení dlouhodobé remise u 4 z 5 pacientů, zaznamenáno bylo pouze mírné zvýšení hladiny cytokinů (Brentjens et al., 2013). V další klinické studii týkající se léčby dětí s B-ALL, byli léčeni 2 pacienti s relapsem. Po infuzi CART19 došlo k rychlému namnožení a rozšíření do kostní dřeně i cerebrospinální tekutiny. Bohužel se u obou pacientů projevil CRS (Cytokine Release Syndrom). U prvního pacienta byl CRS závažný, ale byl úspěšně zaléčen a nebyl poškozen účinek CARů. Kompletní remise byla pozorována u obou dětí, u jednoho z nich se nicméně projevil relaps (již bez exprese CD19) (Grupp et al., 2014). Další studie byly provedeny na dětech a mladých dospělých do 30. roku života. Tento klinický experiment byl zaměřen na pacienty s B-ALL a non-Hodgkinovým lymfomem (NHL). 19 pacientů bylo předléčeno chemoterapií (fludarabin a cyklofosfamid) a byla jim podána jedna celá dávka CART19 v množství  $1 \cdot 10^6$  CART/kg. Zde byly zaznamenány jen 3 případy závažného CRS a dále několik případů hypokalémie a horečky. Během dalších měsíců sledování však bylo zjištěno, že CART19 sice úspěšně léčí leukémii, ale zároveň se proti nim velmi rychle vyvíjí imunitní odpověď T-lymfocytů, které je eliminují. Výsledkem této terapie tedy bylo odstranění leukemických buněk a obnovení normální hladiny B-lymfocytů (Lee et al., 2015).

U **chronické B-buněčné lymfocytární leukémie (B-CLL)** nemají symptomy tak závažný průběh jako u B-ALL a onemocnění bývá málokdy maligní. Přemnožení lymfocytů je ovšem spojeno s celou řadou zdravotních problémů, např. trombocytopenií. Vědci z Pensylvánské univerzity testovali CART19 s 4-1BB na 3 pacientech s pokročilou B-CLL, nereagující na chemoterapii. Byla jim podána silná dávka lymfodepleční chemoterapie 1 – 4 dny před infuzí CART, která byla rozdělena do několika dávek. Po podání infuzí CART pacientům byla zjištěna zvýšená hladina cytokinů a lehké symptomy CRS, které se však rychle vrátily k normálu. Až mezi 7. a 21. dnem se objevily silnější projevy, které však opět rychle vymizely. Během pozorování v dalších 4 letech se žádné další toxické účinky neprojeví. Výsledkem této studie jsou 2 kompletní remise B-CLL a jedna částečná (Kalos et al., 2011). Klinická studie, kde byla také použita 2. generace CARů s 4-1BB a CD3 $\zeta$ , byl CAR zaměřen opět proti CD19 antigenu. Pacient s diagnózou I. stádia B-CLL z roku 1996 prodělal několikanásobnou klasickou léčbu chemoterapií, v roce 2009 však došlo k akutnímu relapsu a

byl zařazen do první fáze klinických testů CART imunoterapie. 4 dny před infuzí CART19 suspenze pacient podstoupil chemoterapii (pentostatin a cyklofosfamid). Následně byla připravena infuze CART, dávkování bylo rozděleno do 3 dnů a neprojevyly se žádné momentální vedlejší účinky, včetně CRS. Po 2 týdnech pacient pociťoval únavu a nastoupily horečky, těžké závratě a poškození ledvin. Symptomy byly залéčeny, do 1 měsíce vymizely a B-CLL již nebyla detekována. Remise pokračovala dalších 10 měsíců (Porter et al., 2011).

Vedle antigenu CD19 je pro CART terapii nadějí také antigen CD20. Jedná se o další B-lymfocytární antigen, kódovaný genem MS4A1, který patří do skupiny TAA. Vyskytuje se na lymfomu plášťových buněk (MCL = mantle cell lymphoma), Hodgkinově lymfomu nebo myelomu. Proti CD20 byla testována třetí generace CARů (CART20) na 3 pacientech, kteří podstoupili lymfodepleci cyklofosfamidem. Výsledky prokázaly protinádorovou aktivitu CART20, objevil se jeden výskyt CRS (pacientovo onemocnění neprodělalo změny) a u dvou pacientů byla pozorována částečná remise, bohužel v jednom případě došlo po 12 měsících k relapsu onemocnění (Till et al., 2012). Vzhledem k výskytu obou antigenů (CD19 i CD20) na postižených B-lymfocytech, byl vyvinut TanCAR. Ten zajišťuje kontrolu nad maligními B-lymfocyty, které ztratily expresi jednoho z těchto antigenů. Tím je zajištěna obrana před únikovým mechanismem ztráty antigenu. (Zah et al., 2016).

### 3.3.2 Solidní nádory

Výzkum CAR terapie u solidních nádorů se potýká s mnoha problémy. Obecně nejobtížnějšími jsou TAA vyskytující se na životně důležitých tkáních a špatná perzistence a aktivita samotných CAR T-lymfocytů, jelikož po silné imunosupresi je i pro CAR T-lymfocyty obtížné v organismu přežít.

#### 3.3.2.1 Neuroblastom

**Neuroblastom** je maligní nádor, který se nejčastěji vyskytuje u dětí do 10 let věku a je odvozen od buněk nervové tkáně. Je to jeden ze solidních nádorů, proti kterému byl vytvořen CAR tvořený CD28, OX-40 a  $\zeta$  řetězcem a cílený na TAA, GD2. Prvotní studie probíhala *in vitro*, kdy byla pro zvýšení efektivity terapie do T-lymfocytů spolu s CAREm vložena izoforma b chemokinového receptoru druhého typu (CCR2). Exprese CCR2b zlepšila infiltraci GD2-CAR T-lymfocytů do neuroblastomů, které produkují velké množství CCL2. (Craddock et al., 2010). Pozdější, již klinická studie Louis et al., 2014 ukazuje úspěchy GD2 CAR T-lymfocytů.

Bylo testováno 19 pacientů s rizikovým neuroblastomem (včetně 11 pacientů z 1. klinického testu GD2-CAR). Jedním z úspěchů bylo prodloužení životnosti CARu na déle než 6 měsíců a u 3 pacientů z 1. klinického testování byla zaznamenána komplexní reakce na léčbu.

#### 3.3.2.2 *Karcinom prsu*

Léčbou CART byly však několikrát vyvolány závažné vedlejší efekty. Bylo tomu tak u CART proti karcinomu prsu. CAR byl sestaven z CD28, 4-1BB a CD3 $\zeta$ , byl zacílen na antigen ERBB2 (HER2/neu) a byl použit  $\gamma$  retrovirový vektor. Zde byla do klinického testování zařazena pouze 1 pacientka, které byla podána infuze  $10^{10}$  ERBB2-CAR T-lymfocytů. Během velmi krátké doby měla pacientka respirační obtíže a na RTG byla nalezena nahromaděná tekutina v plicích. I přes intubaci a intenzivní lékařskou péči pacientka po 5 dnech zemřela. Z testů byla patrná zvýšená hladina IFN- $\gamma$ , makrofágů, TNF- $\alpha$ , IL-6 a IL-10, což prokázalo cytokinovou bouři. Následně byl antigen ERBB2 objeven na plicní a v malé míře i srdeční tkáni (Morgan et al., 2010). V další preklinické studii byl testován CAR s dvojí specifitou pro ERBB2 a Mucin 1, oba jsou TAA vyskytující se jak na normálních epiteliálních buňkách, tak na adenokarcinomech, myelomech i dalších. Vše probíhalo *in vitro* na 3 různých buněčných liniích. Tento CAR zajistil aktivaci T-lymfocytu v přítomnosti obou antigenů i po snížení exprese Mucinu 1 a indukoval také produkci IFN- $\gamma$  (Wilkie et al., 2012).

#### 3.3.2.3 *Karcinom ledvin*

Starší klinickou studií bylo testování cílených T-lymfocytů proti epitopu karboanhydrázy IX (CAIX), hlavnímu cílenému antigenu u karcinomu ledvin s již rozšířenými metastázami. Dávkování infuzí bylo rozděleno vždy po 2 dávkách denně, které lékaři postupně zvyšovali až na  $2 \times 10^9$  buněk v infuzi. Infuze byly doplněny o IL-2. V této studii se jednalo o 3 pacienty s renálním karcinomem, který metastázoval a pacienti byli více než 6 měsíců po léčbě IFN- $\alpha$ . Dle lékařské zprávy byla vůči CAIX CAR T-lymfocytům ze začátku dobrá tolerance, po několika infuzích nastaly problémy s toxicitou. Jeden pacient musel být zaléčen kortikosteroidy, zbylým byly sníženy dávky infuzí. Všichni pacienti nicméně vykazovali progresi v onemocnění a toxicitu na játrech, následně po biopsii byla objevena nízká exprese CAIX na žlučových kanálcích v játrech. Pokud bude exprese CARu v T-lymfocytu regulována, mohla by se karboanhydráza IX stát dobrým cílem (Lamers et al., 2006).

#### 3.3.2.4 *Karcinom vaječníků*

Dále byly CAR T-lymfocyty testovány u karcinomu vaječníků. V první klinické fázi byly použity T-lymfocyty proti TAA, folátovému receptoru alfa (FR). Pacientky byly rozděleny na 2 skupiny, první byla léčena dávkou FR CAR T-lymfocytů spolu s dávkou IL-2 a druhá skupina obdržela dávku dvojité specifických T-lymfocytů, nesoucích CAR proti FR a reagujícími s alogenními nádorovými buňkami pomocí svého T-receptoru, spolu s imunizací pomocí alogenních buněk z periferní krve. Výsledkem bylo, že z celkově 14 léčených patientek většina snášela léčbu dobře, pouze u malé části se objevila toxicita 3. – 4. řádu, pravděpodobně z důvodu vysokých dávek IL-2. Bohužel u žádné z patientek nebyla zaznamenána regrese tumoru (Kershaw et al., 2006). O několik let později byl testován antigen ERBB2 (HER2/neu) s výsledkem dostatečné imunologické hladiny v organismu. Karcinomy vaječníků může způsobovat mutace v protoonkogenu ERBB2 podobně jako u karcinomu prsu a právě špatná regulace způsobí nekontrolovatelný růst buněk a expresi na většině z nich. Byl by tedy další nadějí pro léčbu CART u solidních nádorů. (Lanitis et al., 2012).

#### 3.3.2.5 *Mezoteliom*

Mezoteliom je maligní nádor mezotelu, tkáň vystýlající dutiny a chránící orgány lidského těla. Pro terapii proti mezoteliomu byly vytvořeny CAR T-lymfocyty cílené na mezotelin (MSLN). V klinické studii Beatty et al., 2014 byli léčeni 2 pacienti a pro zvýšení bezpečnosti byly v 1. fázi testování využity mRNA CAR T-lymfocyty, kdy je mRNA vpravena do buněk elektroporací a je zajištěna pouze přechodná exprese CARu. Výsledek studie prokázal bezpečnost v cílení mezotelinu, a že tyto CART jsou schopné migrace do nádoru a dlouhodobé perzistence.

## 4 Závěr

Nádorová onemocnění jsou velmi závažná a jejich výskyt v populaci stoupá (Parkin et al., 2005; Torre et al., 2015). Chemoterapie a ozařování, které jsou běžnou léčbou, jsou do jisté míry kontraproduktivní. Není zde jistota, že budou zaměřeny pouze nebo převážně na nádorové buňky, a proto pacientovi často více uškodí. Pro větší efektivitu léčby a větší bezpečnost pro pacienty se začala rozvíjet cílená imunoterapie, do které patří právě chimérické antigenní receptory (CARy). Ty jsou založené na přesném zacílení antigenu na povrchu nádorových buněk. Bohužel se i tato inovativní léčba potýká s mnoha problémy. Dané antigeny nejsou exprimovány jen na nádorových buňkách, ale jsou ve většině případů i na zdravých, často životně nezbytných tkáních. CAR T-lymfocyty poté sice efektivně eliminují nádorové buňky, ale také veškerou zdravou tkáň s tímto antigenem, což pak přináší pacientovi velké problémy, které jsou často fatální. Na druhou stranu, u hematologických malignit (leukémie apod.) by CAR T-lymfocyty mohly znamenat pro pacienty velkou naději. CAR T-lymfocyty zaměřené proti antigenu CD19, vyskytujícímu se na B-lymfocytech, spolehlivě zlikvidují nádorové buňky a chybějící B-lymfocyty pacientovi nahradí infuze.

Léčba CAR T-lymfocyty má však i další úskalí. Vzhledem k agresivitě takto aktivovaných CAR T-lymfocytů dojde ke zvýšení hladin prozánětlivých cytokinů. Ne vždy je tato skutečnost život ohrožující, může však způsobit nepříjemné vedlejší účinky (horečky, únava, závratě atd.).

V případě solidních nádorů je léčba pouze v prvních fázích testování, únikové mechanismy těchto typů nádorů léčbu značně ztěžují, počínaje neproniknutelným nádorovým mikroprostředím, přes snížení exprese antigenu až po samotný „protiútok“ nádorových buněk zneškodňováním CAR T-lymfocytů.

V nejnovějších studiích se vědci již snaží o alternativy CARů, které budou dostatečně efektivní v boji s nádory, ale zároveň šetrné k organismu. Mezi ně patří „switch-on“ CARy s „vypínačem“ jejich aktivity. Další vývoj směřuje k typům schopným překonat mikroprostředí solidních nádorů nebo obejít jejich únikový mechanismus snížením exprese hlavního antigenu.

CARy jsou tedy velmi slibnou technologií pro léčbu hematologických malignit a ve vzdálenější budoucnosti možná i naději pro pacienty s rakovinou obecně. Prozatím však CAR T-lymfocyty stále provází příliš mnoho problémů na to, aby mohly být považovány za hlavní imunoterapeutickou možnost.

## 5 Literatura

Adusumilli, Prasad S.; Cherkassky, Leonid; Villena-Vargas, Jonathan; Colovos, Christos; Servais, Elliot; Plotkin, Jason; Jones, David R.; Sadelain, M. (2014). Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity. *Sci Transl Med.* 6, 1–18

Ahmad, M., Rees, R.C., and Ali, S.A. (2004). Escape from immunotherapy: Possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 844–854.

Jensen M.C and Riddell S. R. (2014). Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells. *Immunol Rev.* 141, 520–529.

Beatty, G.L., Haas, a R., Maus, M. V, Torigian, D. a, Soulen, M.C., Plesa, G., Chew, a, Zhao, Y., Levine, B.L., Albelda, S.M., Kalos M., June C. H. (2014). Mesothelin-specific Chimeric Antigen Receptor mRNA-Engineered T cells Induce Anti-Tumor Activity in Solid Malignancies. *Cancer Immunol Res* 2, 112–120.

Boomer, J. S. and Green J. M. (2010) An enigmatic Tail of CD28 Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in biology.* 2, 1-20

Boon, T., and van der Bruggen, P. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183, 725–729.

Boon, T., Coulie, P.G., and Van den Eynde, B. (1997). Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol. Today* 18, 267–268.

Brandl, C., Haas, C., D'Argouges, S., Fisch, T., Kufer, P., Brischwein, K., Prang, N., Bargou, R., Suzich, J., Baeuerle, P. A and Hofmeister R. (2007). The effect of dexamethasone on polyclonal T cell activation and redirected target cell lysis as induced by a CD19/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 1551–1563.

Brentjens, R., Davila, M.L., Riviere, I., Park, J., Cowell, L.G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Borquez-ojeda, O., Qu, J., Wasielewska T., Quing H., Bernal Y., Rijo I.V., Hedvat C., Kobos R., Curran K., Steinherz P., Jurcic J., Rosenblat T., Maslak P., Frattini M., Sadelain M. (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 5.

Bridgeman, J.S., Hawkins, R.E., Bagley, S., Blaylock, M., Holland, M., and Gilham, D.E. (2010). The Optimal Antigen Response of Chimeric Antigen Receptors Harboring the CD3 Transmembrane Domain Is Dependent upon Incorporation of the Receptor into the Endogenous TCR/CD3 Complex. *J. Immunol.* 184, 6938–6949.

Brownlie J. R and Zamoyska R. (2013) T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nature reviews. Immunology.* 13, 257-69

Carpenito, C., Milone, M.C., Hassan, R., Simonet, J.C., Lakhal, M., Suhoski, M.M., Varela-Rohena, A., Haines, K.M., Heitjan, D.F., Albelda, S.M., Carroll R. G., Riley J.L., Pastan I., June C. H. (2009). Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted

- human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 3360–3365.
- Casucci, M., and Bondanza, A. (2011). Suicide gene therapy to increase the safety of chimeric antigen receptor-redIRECTED T lymphocytes. *J. Cancer* 2, 378–382.
- Craddock, J.A., Lu, A., Bear, A., Pule, M., Brenner, M.K., Rooney, C.M., and Foster, A.E. (2010). Enhanced Tumor Trafficking of GD2 Chimeric Antigen Receptor T Cells by Expression of the Chemokine Receptor CCR2b. *J. Immunother.* 33, 780–788.
- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., and Schindler, D.G. (1993). Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 720–724.
- Eshhar, Z., Waks, T., Bendavid, A., and Schindler, D.G. (2001). Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells. *J. Immunol. Methods* 248, 67–76.
- Fedorov, V.D., Themeli, M. and Sadelain, M. (2013). PD-1- and CTLA-4-Based Inhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses. *Science Translational Medicine.* 5, 215-172
- FERRARA, J.L.M., ABHYANKAR, S., and GILLILAND, D.G. (1993) Cytokine storm of graft-versus-host disease : a critical effector role for interleukin-1. *Transplant. Proc.* 25, 1216–1217.
- Finney, H.M., Akbar, A.N., and Lawson, A.D.G. (2004). Activation of Resting Human Primary T Cells with Chimeric Receptors: Costimulation from CD28, Inducible Costimulator, CD134, and CD137 in Series with Signals from the TCR Chain. *J. Immunol.* 172, 104–113.
- Garcon, F., Patton, D.T., Emery, J.L., Hirsch, E., Rottapel, R., Sasaki, T., and Okkenhaug, K. (2008). CD28 provides T-cell costimulation and enhances PI3K activity at the immune synapse independently of its capacity to interact with the p85/p110 heterodimer. *Blood* 111, 1464–1471.
- Godfrey, B.W.R., Fagnoni, F.F., Harara, M.A., Buck, D., Engleman, E.G., Harara, M.A., and Engleman, E.G. (1994). Identification of a human OX-40 Ligand, a costimulator of CD4+ T Cells with homology to tumor necrosis factor. *Brief Definitive Report.* 180
- Grada, Z., Hegde, M., Byrd, T., Shaffer, D.R., Ghazi, A., Brawley, V.S., Corder, A., Schönfeld, K., Koch, J., Dotti, G., Heslop H.E., Gottschalk S., Wels W.S., Baker M.L., Ahmed N. (2013). TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol. Ther. Acids* 2, e105.
- Grupp S. A., Kalos M., Barrett D., Aplenc R., Porter D. L., Rheingold S. R., Teachey D. T., Chew, A., Ph, D., Hauck, B., Wright, J.F., Milone, M.C., Levine B. L. and June C. H. (2014). Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med.* 368, 1509–1518.
- Haynes, N.M., Snook, M.B., Trapani, J.A., Cerruti, L., Jane, S.M., Smyth, M.J., and Darcy, P.K. (2001). Redirecting Mouse CTL Against Colon Carcinoma: Superior Signaling Efficacy

of Single-Chain Variable Domain Chimeras Containing TCR- $\zeta$  vs Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$ . *J. Immunol.* 166

Haynes, N.M., Trapani, J.A., Teng, M.W.L., Jackson, J.T., Cerruti, L., Jane, S.M., Kershaw, M.H., Smyth, M.J., and Darcy, P.K. (2002). Rejection of Syngeneic Colon Carcinoma by CTLs Expressing Single-Chain Antibody Receptors Codelivering CD28 Costimulation. *J. Immunol.* 169, 5780–5786.

Hermanson, D.L., and Kaufman, D.S. (2015). Utilizing Chimeric Antigen Receptors to Direct Natural Killer Cell Activity. *Front. Immunol.* 6, 195.

Hombach, A. a, and Abken, H. (2011). Costimulation by chimeric antigen receptors revisited the T cell antitumor response benefits from combined CD28-OX40 signalling. *Int. J. Cancer* 129, 2935–2944.

Hombach, A., Wieczarkowicz, A., Marquardt, T., Heuser, C., Usai, L., Pohl, C., Seliger, B., and Abken, H. (2001). Tumor-Specific T Cell Activation by Recombinant Immunoreceptors: CD3 Signaling and CD28 Costimulation Are Simultaneously Required for Efficient IL-2 Secretion and Can Be Integrated Into One Combined CD28/CD3 Signaling Receptor Molecule. *J. Immunol.* 167, 6123–6131.

Humphreys, I.R., Walzl, G., Edwards, L., Rae, A., Hill, S., and Hussell, T. (2003). A critical role for OX40 in T cell-mediated immunopathology during lung viral infection. *J. Exp. Med.* 198, 1237–1242.

Huntington, N.D., and Tarlinton, D.M. (2004). CD45: Direct and indirect government of immune regulation. *Immunol. Lett.* 94, 167–174.

Chandan, V.S., Shah, S.S., Torbenson, M.S., and Wu, T.-T. (2016). Arginase-1 Is Frequently Positive in Hepatoid Adenocarcinomas. *Hum. Pathol.* [Ahead of print]

Chmielewski, M., and Abken, H. (2012). CAR T cells transform to trucks: chimeric antigen receptor-redirected T cells engineered to deliver inducible IL-12 modulate the tumour stroma to combat cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 1269–1277.

Chmielewski, M., Hombach, A.A., and Abken, H. (2014). Of CARs and TRUCKs: Chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunol. Rev.* 257, 83–90.

Chomez, P., Backer, O. De, Bertrand, M., Plaen, E. De, Boon, T., and Lucas, S. (2001). An Overview of the MAGE Gene Family with the Identification of All Human Members of the Family An Overview of the MAGE Gene Family with the Identification of All Human Members of the Family 1. *Cancer Res.* 61, 5544–5551.

Imai, C., Mihara, K., Andreansky, M., Nicholson, I.C., Pui, C.-H., Geiger, T.L., and Campana, D. (2004). Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic. *Leukemia* 18, 676–684.

Izsvák, Z., Ivics, Z., and Plasterk, R.H. (2000). Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J. Mol. Biol.* 302, 93–102.

Kalos, M., Levine, B.L., Porter, D.L., Katz, S., Grupp, S. a, Bagg, A., and June, C.H. (2011).



T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci. Transl. Med.* 3, 95-73.

Kershaw, M.H., Westwood, J.A., Parker, L.L., Wang, G., Eshhar, Z., Mavroukakis, S.A., White, D.E., Wunderlich, J.R., Canevari, S., Rogers-Freezer, L., Chen C.C., Yang J.C., Rosenberg S.A., Hwu P. (2006). A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 6106–6115.

Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S., Holland, J.F., and Frei, E. (2003). Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. [kniha] Categories of Tumor Antigens. *NCBI Bookshelf*

Kunkele, A., Johnson, A.J., Rolczynski, L.S., Chang, C.A., Hoglund, V., Kelly-Spratt, K.S., and Jensen, M.C. (2015). Functional Tuning of CARs Reveals Signaling Threshold above Which CD8<sup>+</sup> CTL Antitumor Potency Is Attenuated due to Cell Fas-FasL-Dependent AICD. *Cancer Immunol Res* 3, 368–379.

Lamers, C.H.J., Sleijfer, S., Vulto, A.G., Kruit, W.H.J., Kliffen, M., Debets, R., Gratama, J.W., Stoter, G., and Oosterwijk, E. (2006). Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J. Clin. Oncol.* 24, 22–24.

Lanitis, E., Dangaj, D., Hagemann, I.S., Song, D.G., Best, A., Sandaltzopoulos, R., Coukos, G., and Powell, D.J. (2012). Primary Human Ovarian Epithelial Cancer Cells Broadly Express HER2 at Immunologically-Detectable Levels. *PLoS One* 7.

Lee, D.W., Gardner, R., Porter, D.L., Louis, C.U., Ahmed, N., Jensen, M., Grupp, S.A., and Mackall, C.L. (2014). Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 124, 188–195.

Lee, D.W., Kochenderfer, J.N., Stetler-Stevenson, M., Cui, Y.K., Delbrook, C., Feldman, S.A., Fry, T.J., Orentas, R., Sabatino, M., Shah, N.N., Steinberg S. M., Stroncek D., Tschernia N., Yuan C., Zhang H., Zhang L., Rosenberg S. A., Wayne A. S., Mackall C. L. (2015). T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 385, 517–528.

Louis, C.U., Savoldo, B., Dotti, G., Pule, M., Yvon, E., Myers, G.D., Rossig, C., Russell, H. V, Diouf, O., Liu, E., Wu M., Gee A.P., Mei Z., Rooney C.M., Heslop H.E., Brenner M.K. (2014). Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor – positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood J.* 118, 1–3.

Lsakov, N. (1997). Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades. *J. Leukoc. Biol.* 61, 6–16.

Mandruzzato, S., Brandau, S., Britten, C.M., Bronte, V., Damuzzo, V., Gouttefangeas, C., Maurer, D., Ottensmeier, C., van der Burg, S.H., Welters, M.J.P., Walter S. (2016). Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. *Cancer Immunol. Immunother.* 65, 161–169.

- Maude S.L., Barrett D., Teachey D.T. and Grupp S. A. (2014). Managing Cytokine Release Syndrome Associated With Novel T Cell-Engaging Therapies. *Cancer J.* 20, 119–122.
- Minagawa, K., Zhou, X., Mineishi, S., and Di Stasi, A. (2015). Seatbelts in CAR therapy: How Safe Are CARS? *Pharmaceuticals.* 8, 230–249.
- Mitchison N.A. (1955) Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse. *J Exp Med.* 102(2), 157-77
- Moeller, M., Haynes, N.M., Trapani, J. a, Teng, M.W.L., Jackson, J.T., Tanner, J.E., Cerutti, L., Jane, S.M., Kershaw, M.H., Smyth, M.J., Darcy P.K. (2004). A functional role for CD28 costimulation in tumor recognition by single-chain receptor-modified T cells. *Cancer Gene Ther.* 11, 371–379.
- Morgan, R.A., Yang, J.C., Kitano, M., Dudley, M.E., Laurencot, C.M., and Rosenberg, S.A. (2010). Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2. *Mol. Ther.* 18, 843–851.
- Ninomiya S., Narala N., Huye L., Yagyu S., Savoldo B., Dotti G., Heslop H. E., Brenner M. K., Rooney C M. and Ramos C. A. (2015) Tumor indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibits CD19-CAR T cells and is downregulated by lymphodepleting drugs. *Blood.* 125(25)
- Parker, K.H., Beury, D.W., and Ostrand-rosenberg, S. (2015). Suppression in the Tumor Microenvironment. *Adv Cancer Res.* 128, 1–39.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA. Cancer J. Clin.* 55, 74–108.
- Pitcher, L.A., and Van Oers, N.S.C. (2003). T-cell receptor signal transmission: Who gives an ITAM? *Trends Immunol.* 24, 554–560.
- Porter D. L., Levine B. L, Kalos M, Bagg A. and June, C.H. (2011). Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med.* 365, 725–733
- Ramos, C. a, Savoldo, B., and Dotti, G. (2014). CD19-CAR trials. *Cancer J.* 20, 112–118.
- Shipp, M. a, Vijayaraghavan, J., Schmidt, E. V, Masteller, E.L., D’Adamio, L., Hersh, L.B., and Reinherz, E.L. (1989). Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 (“enkephalinase”): direct evidence by cDNA transfection analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 297–301.
- So, T., and Croft, M. (2013). Regulation of PI-3-kinase and Akt signaling in T lymphocytes and other cells by TNFR family molecules. *Front. Immunol.* 4, 1–11.
- So, T., Soroosh, P., Eun, S.-Y., Altman, A., and Croft, M. (2011). Antigen-independent signalosome of CARMA1, PKC $\theta$ , and TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) determines NF- $\kappa$ B signaling in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2903–2908.
- Suerth, J.D., Schambach, A., and Baum, C. (2012). Genetic modification of lymphocytes by retrovirus-based vectors. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 598–608.

- Taraban, V.Y., Rowley, T.F., O'Brien, L., Claude Chan, H.T., Haswell, L.E., Green, M.H. a, Tutt, A.L., Glennie, M.J., and Al-Shamkhani, A. (2002). Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. *Eur. J. Immunol.* 32, 3617–3627.
- Till, B.G., Jensen, M.C., Wang, J., Qian, X., Gopal, A.K., Maloney, D.G., Lindgren, C.G., Lin, Y., Pagel, J.M., Budde, L.E., Raubitschek A., Forman S.J., Greenberg P.D., Riddell S.R., Press O.W. (2012). CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: Pilot clinical trial results. *Blood* 119, 3940–3950.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA a Cancer J. Clin.* 65, 87–108.
- Trédan, O., Galmarini, C.M., Patel, K., and Tannock, I.F. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 1441–1454.
- Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2003). The IL-12 Family of Heterodimeric Cytokines. *Immunity* 19, 641–644.
- Vinay D. S. and Kwon B. S. (2011). TNF Superfamily Pathway. *Cell Biol Int.* 33, 453–465.
- Wen, T., Bukczynski, J., and Watts, T.H. (2002). 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J. Immunol.* 168, 4897–4906.
- Wieczorek, A., and Uharek, L. (2013). Genetically Modified T Cells for the Treatment of Malignant Disease. *Transfus. Med. Hemotherapy* 40, 388–402.
- Wilkie, S., Van Schalkwyk, M.C.I., Hobbs, S., Davies, D.M., Van Der Stegen, S.J.C., Pereira, A.C.P., Burbridge, S.E., Box, C., Eccles, S.A., and Maher, J. (2012). Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J. Clin. Immunol.* 32, 1059–1070.
- Wu, C.-Y., Roybal, K.T., Puchner, E.M., Onuffer, J., and Lim, W.A. (2015). Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science* 350, aab4077.
- Zah E., Lin M.Y., Silva-Benedict A., Jensen M.C. and Chen Y.Y. (2016) T cells expressing CD19/CD20 bi-specific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells. *Cancer Immunol Res. Ahead of print.*
- Zarour H. M. and Ferrone S. (2011) Cancer immunotherapy: Progress and challenges in the clinical setting. *Eur J Immunol.* 41(6), 1510-1515